

REC'D 07 JAN 2005

**WIPO**

**PCT**

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 OCT. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété Industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Mitteil

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

**PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)**

**INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE**

**SIEGE**  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.lncl.fr](http://www.lncl.fr)



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2




Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 01/ 210502

REMISE DES PIÈCES DATE <b>24 OCT 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>24 OCT. 2003</b> <b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) <b>BLOcp644/115FR</b>		Réservé à l'INPI <b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> <b>À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> ■ <b>CABINET ORES</b> ■ <b>36 rue de St Pétersbourg</b> <b>75008 PARIS</b> ■	
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale		<input type="checkbox"/>	
		N°	Date
<b>3 TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) <b>MAMMIFERE NON-HUMAIN TRANSGENIQUE POUR LA REGION CONSTANTE DE LA CHAÎNE LOURDE DES IMMUNOGLOBULINES HUMAINES DE CLASSE A ET SES APPLICATIONS.</b>			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ</b> <b>OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE</b> <b>LA DATE DE DÉPÔT D'UNE</b> <b>DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR</b> (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	3 rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	75 171 PARIS Cedex 16	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES FICHES DATE <b>24 OCT 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0312502</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 210502
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		<b>ORES</b>	
Nom		Béatrice	
Prénom		CABINET ORES	
Cabinet ou Société			
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	36 rue de St Pétersbourg	
	Code postal et ville	75 000 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01.53.21.11.00.	
N° de télécopie (facultatif)		01.53.21.08.88.	
Adresse électronique (facultatif)		ores@cabinet-ores.com	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, Béatrice ORES (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 	

La présente invention est relative à un mammifère non-humain transgénique pour la région constante de la chaîne lourde des immunoglobulines humaines de classe A et à ses applications pour la production d'anticorps humanisés de classe IgA.

5 Les immunoglobulines A (IgA) comprennent deux chaînes lourdes identiques, d'isotype  $\alpha 1$  (sous-classe IgA1) ou  $\alpha 2$  (sous-classe IgA2) chez l'homme, associées par l'intermédiaire de ponts disulfures, à deux chaînes légères identiques d'isotype kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ).

10 La chaîne lourde  $\alpha$ , qui est spécifique de cette classe d'immunoglobulines, existe sous forme membranaire et sous forme sécrétée. La forme sécrétée comprend quatre domaines d'environ 110 acides aminés : un domaine variable VH et trois domaines constants CH1, CH2 et CH3, ainsi qu'une région charnière (H) entre CH2 et CH3 et un octapeptide C-terminal. L'avant-dernière  
15 cystéine de cet octapeptide peut former une liaison covalente avec la chaîne J (ou pièce de jonction) qui sert à associer deux chaînes lourdes d'IgA de façon à former des IgA dimériques. La forme membranaire comprend en outre un domaine hydrophobe permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane, ainsi qu'un domaine intracytoplasmique. La région de la chaîne lourde correspondant aux domaines CH1, CH2, H, CH3 associés, soit à l'octapeptide C-terminal (forme sécrétée), soit au domaine hydro-  
20 phobe et intracytoplasmique (forme membranaire), est dénommée région constante par opposition à la région correspondant au domaine variable VH, qui est dénommée région variable.

Les chaînes légères  $\kappa$  et  $\lambda$ , qui sont communes à l'ensemble des classes et sous-classes d'immunoglobulines, comprennent deux domaines : un  
25 domaine variable (VL) et un domaine constant (CL). Chez l'Homme, l'expression des chaînes  $\kappa$  et  $\lambda$  est équivalente, alors que chez la souris l'expression du locus  $\lambda$  est très faible de telle sorte que 95 % des chaînes légères sont de type  $\kappa$ . La région de la chaîne légère correspondant au domaine CL est dénommée région constante par opposition à la région correspondant au domaine variable VL, qui est dénommée région variable.

30 Les gènes des immunoglobulines sont organisés en locus, un locus pour les chaînes lourdes (locus IgH) et un locus pour chacune des chaînes légères (locus lambda et kappa).

Les locus des chaînes légères comprennent chacun des gènes V et J codant pour le domaine variable et des gènes C codant pour le domaine constant ; au cours de la différenciation des lymphocytes B, un gène V est réarrangé avec un gène J et un gène C, et la région V subit en outre des mutations somatiques qui permettent de  
5 produire des anticorps de forte affinité pour l'antigène.

Le locus des chaînes lourdes comprend des gènes V, D et J codant pour le domaine variable et des gènes C ( $C_\mu$ ,  $C_\delta$ ,  $C_\gamma$ ,  $C_\epsilon$  et  $C_\alpha$ ) codant pour les domaines constants des isotypes des différentes classes d'immunoglobulines ; chaque gène C, sauf  $C_\delta$ , est précédé d'une séquence de commutation ou « switch » (S). Les  
10 gènes  $C_\alpha$  ( $C_{\alpha 1}$  et  $C_{\alpha 2}$  chez l'homme) contiennent des introns séparant les exons codant pour les domaines constants CH1, CH2 et CH3 et l'exon de membrane (mb) ; la séquence codant pour la région charnière est incluse dans l'exon CH2. Au cours de la différenciation des lymphocytes B, un gène V est réarrangé avec un gène D et un gène J, et la région V subit également des mutations somatiques qui permettent de  
15 produire des anticorps de forte affinité pour l'antigène. En outre, alors que la réponse primaire à l'antigène est constituée principalement d'IgM, la réponse secondaire est associée au mécanisme de commutation de classe au cours duquel la séquence de commutation  $S_\mu$ , située en amont de  $C_\mu$  recombine avec une autre séquence de commutation conduisant ainsi la production d'une autre classe d'immunoglobuline  
20 (IgG, IgE ou IgA).

La diversité des anticorps produits en réponse à la stimulation par un antigène provient de la combinaison de plusieurs mécanismes : la multiplicité des gènes V, la mutation somatique de ces gènes V, la recombinaison somatique des gènes V et la recombinaison somatique des séquences de commutation.

25 Les IgA existent dans l'organisme sous deux formes différentes : une IgA sérique et une IgA sécrétoire (s-IgA).

L'IgA sérique représente 15 à 20 % des immunoglobulines sériques ; plus de 80 % de l'IgA sérique humaine est sous forme de monomère, alors que chez la plupart des autres espèces de mammifères, elle est essentiellement sous forme de  
30 dimère.

L'IgA sécrétoire constitue la principale immunoglobuline des sécrétions (oculaires, salivaires, mammaires, trachéobronchiques et urogénitales), où elle

est existe sous la forme d'un dimère d'IgA associé à une autre protéine, le composant sécrétoire, qui est probablement enroulé autour du dimère d'IgA et attaché par des ponts disulfures au domaine CH2 de chaque monomère d'IgA. Contrairement à la chaîne J, la pièce sécrétoire n'est pas synthétisée par les plasmocytes mais par les  
 5 cellules épithéliales. L'IgA dimérique sécrétée par les plasmocytes sous-épithéliaux se lie aux récepteurs poly-Ig présents au pôle basal des cellules épithéliales. Le complexe s-IgA/récepteur est alors endocyté et transporté à travers la cellule tout en restant fixé à la membrane des vésicules de transport. Celles-ci fusionnent avec la membrane plasmique à la surface luminale et libèrent l'IgA dimérique associée à la pièce sécré-  
 10 toire qui provient du clivage du récepteur. Ainsi la pièce sécrétoire facilite le transport des IgA dans les sécrétions et les protège de la protéolyse.

Du fait de leur capacité à traverser l'épithélium des muqueuses et à prévenir l'entrée de pathogènes comme les virus, les bactéries, les parasites et les toxines, les IgA jouent un rôle majeur dans l'immunité locale : oculaire, respiratoire,  
 15 digestive et urogénitale. Le mode d'action des IgA englobe des mécanismes actifs (activation du complément, liaison au récepteur Fc) et passifs (blocage des récepteurs des pathogènes (virus) et inhibition de la motilité des bactéries). Une corrélation étroite entre une réponse IgA spécifique et la protection contre une infection a été démontrée, notamment pour des virus (rotavirus, virus influenza, poliovirus, cyto-  
 20 mégalo-virus, virus respiratoire syncytial, virus Epstein-Barr). Des anticorps protecteurs de classe IgA dirigés contre de nombreux pathogènes humains (VIH, virus influenza A, bactéries, toxines, parasites) ont été isolés.

En raison de cette propriété particulière, les IgA ont des applications spécifiques pour le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses et du cancer.  
 25 Elles pourraient être utilisées en immunothérapie passive pour neutraliser des pathogènes (sérothérapie). Elles pourraient également être utilisées en immunothérapie active (vaccination) comme vecteur pour cibler des antigènes de tumeurs ou de micro-organismes pathogènes dans les muqueuses, de façon à induire une immunité locale spécifique de ces antigènes. En outre, elles sont utiles comme réactif fiable, sûr, stable  
 30 et bien défini pour le diagnostic de maladies comme la maladie cœliaque, en remplacement des IgA humaines (IgA anti-transglutaminase, anti-endomysium, anti-gliadine)

provenant des patients, qui exposent les manipulateurs à des risques de transmission de pathogènes humains (virus, prion).

Toutefois, le développement de ces applications est limité du fait qu'il n'existe pas de méthode efficace de production d'anticorps recombinants humains ou humanisés, de classe IgA.

On entend par anticorps humanisé, un anticorps dérivé d'un mammifère non-humain par fusion des domaines constants des chaînes lourdes et légères d'un anticorps humain avec les domaines variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps d'un mammifère non-humain.

En effet, les méthodes de productions d'anticorps recombinants humains ou humanisés actuellement disponibles présentent les inconvénients suivants :

\* les méthodes *in vitro* reposent sur l'expression simultanée, à partir d'un ou plusieurs vecteurs recombinants, de chaînes lourdes et légères d'anticorps, d'une chaîne J, et éventuellement d'une pièce sécrétoire ; les chaînes lourdes et légères comprennent les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH et VL) d'un anticorps monoclonal humain ou murin d'intérêt, fusionnés respectivement aux domaines constants CH1, CH2 et CH3 d'une chaîne lourde  $\alpha$ , et C $\lambda$  ou C $\kappa$  d'une chaîne légère humaine, ou bien les domaines VH et VL sont fusionnés à un domaine CH3 incluant l'octapeptide C-terminal (Demandes Internationales PCT WO 98/30577 et PCT WO 99/54484). Par exemple, la Demande Internationale PCT WO 98/30577 décrit la production *in vitro* à l'aide d'un ou plusieurs baculovirus recombinants, de mini-IgA dimériques (IgA-J) recombinantes humaines comprenant les domaines VH et VL d'un anticorps monoclonal murin ou humain, chacun fusionné à un domaine CH3 incluant l'octapeptide C-terminal, associés par l'intermédiaire d'une chaîne J ; une seule mini-IgA recombinante dirigée contre la gp120 du VIH, obtenue à partir d'un anticorps monoclonal humain neutralisant de classe IgG1 (anticorps S1-1), est décrite.

Ces méthodes, qui sont spécifiques des IgA, sont limitées aux anticorps murins et aux quelques rares anticorps humains pour lesquels des hybridomes ont été isolés.

\* les méthodes *in vivo* reposent sur la production d'immunoglobulines monoclonales humaines à partir de souris génétiquement modifiées possédant un transgène constitué par :

- le locus IgH complet et le locus de la chaîne légère kappa, dans leur configuration germinale, (Demande PCT WO 02/059154, Mendez et al., Nature Genetics, 1997, 15, 146-156 ; Green et Jakobovits, J. Exp. Med., 1998, 188, 483-495 et Demande de Brevet américain US n° 08/759,620),

- un mini-locus IgH comprenant un ou plusieurs gènes VH, DH et JH, le gène C $\mu$  et un second gène de la région constante, de préférence de la région C $\gamma$ . et le locus de la chaîne légère kappa (Demande PCT WO 02/059154, Brevet américain US 5,545,807), et

- le locus IgH complet et le locus de la chaîne lambda dans sa configuration germinale (Demande de Brevet américain US n° 09/734,613). Lesdites souris sont éventuellement génétiquement invalidées pour le locus kappa endogène (souris  $\kappa$  -/-) et possèdent éventuellement une mutation qui inactive le locus IgH endogène (mutation  $\mu$ MT -/-).

Ces méthodes ne permettent pas de produire de quantités importantes d'immunoglobulines humaines de classe IgA.

De manière surprenante, les Inventeurs ont construit des lignées de souris transgéniques qui produisent des quantités importantes d'immunoglobulines humanisées de classe IgA (de l'ordre du gramme par litre chez la souris). Les anticorps produits par ces animaux sont majoritairement des IgA humanisées ; ils ne contiennent pas d'IgM et seulement de très faibles quantités des autres classes d'immunoglobulines (IgG et IgE).

En conséquence, l'invention a pour objet un mammifère non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend un locus IgH modifié par remplacement de la séquence de commutation S $\mu$  par tout ou partie d'un transgène constitué par le gène C $\alpha$  d'une immunoglobuline humaine de classe A, incluant au moins l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane.

Conformément à l'invention, le transgène C $\alpha$  ou la partie de ce transgène incluant au moins l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de



membrane, qui est inséré en lieu et place de la séquence de commutation  $S\mu$ , est donc situé entre l'activateur intronique  $E\mu$ , en 5' et le gène  $C\mu$  en 3' (figure 1).

Dans cette construction, la suppression de la séquence de commutation  $S\mu$  associée à l'insertion du transgène  $C\alpha$  en lieu et place de cette séquence, 5 abolit l'expression du gène  $\mu$  endogène responsable de la synthèse de chaînes lourdes d'IgM. En outre, celle des autres gènes de chaînes lourdes d'immunoglobulines est fortement diminuée du fait du blocage de la commutation de classe vers les gènes constants d'immunoglobulines situés en aval de  $C\mu$  sur le locus IgH endogène. Ainsi, les animaux transgéniques obtenus produisent des quantités importantes d'IgA 10 chimériques dont le domaine constant de la chaîne lourde est humanisé et les domaines variables sont d'origine murine.

La chaîne lourde transgénique  $\alpha$  humaine bénéficie d'un répertoire totalement diversifié puisque correspondant au répertoire normal généré par les réarrangements des segments VH, D et JH du locus IgH murin. En outre, les animaux 15 transgéniques sont capables de produire des anticorps de forte affinité en réponse secondaire à l'antigène, du fait que leurs lymphocytes B peuvent recruter le phénomène d'hypermutation somatique.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit mammifère non-humain transgénique est homozygote pour ledit locus IgH modifié. 20

Selon un autre un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit locus IgH est modifié par remplacement de la séquence de commutation  $S\mu$  par la totalité du gène  $C\alpha$ , incluant les exons CH1, CH2, CH3 et mb, séparés par les introns correspondants.

Selon un autre un mode de réalisation avantageux de l'invention, 25 ledit locus IgH est modifié par remplacement de la séquence de commutation  $S\mu$ , par le segment du gène  $C\alpha$  incluant l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane.

Selon un autre un mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit gène  $C\alpha$  est  $C\alpha 1$ .

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit mammifère non-humain transgénique comprend un autre transgène codant pour une chaîne légère d'immunoglobuline humaine.

5 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, la dite chaîne légère est une chaîne kappa.

De préférence, ledit transgène est un gène kappa humain comprenant l'activateur intronique E $\mu$ , en amont et le palindrome *hs3a/hs1,2/hs3b*, en aval. Ces séquences, qui sont décrites dans Chauveau et al., Gene, 1998, 222, 279-285, permettent d'obtenir une forte expression de la chaîne kappa humaine dans les cellules  
10 B et d'induire l'hypermutation somatique du transgène kappa humain. De manière préférée, ledit transgène est sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde humaine (pVH).

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit mammifère non-humain transgénique est dizygote pour ledit transgène.

15 Selon une disposition avantageuse des modes de réalisation précédents de l'invention, lesdits mammifères non-humains transgéniques comprenant un autre transgène codant pour une chaîne légère kappa humaine possèdent un locus endogène de la chaîne légère kappa d'immunoglobulines inactivé (délété ou muté), notamment par recombinaison homologue. De préférence, lesdits mammifères non-  
20 humains transgéniques sont homozygotes pour ladite inactivation ; de manière préférée il s'agit de souris transgéniques. Parmi les mammifères non-humains transgéniques dont le locus endogène de la chaîne légère kappa d'immunoglobuline a été inactivé par recombinaison homologue, on peut citer notamment la lignée de souris décrite dans Zou et al., EMBO J., 1993, 12, 811-820.

25 De tels mammifères non-humains transgéniques produisent des IgA humanisés dont la quasi-totalité des chaînes légères sont d'origine humaine.

Selon une autre disposition avantageuse des modes de réalisation précédents de l'invention, lesdits mammifères non-humains transgéniques pour la chaîne lourde  $\alpha 1$  et éventuellement pour la chaîne légère kappa humaine possèdent un  
30 locus endogène de la chaîne J inactivé (délété ou muté), notamment par recombinaison homologue. De préférence, lesdits mammifères non-humains transgéniques sont homozygotes pour ladite inactivation ; de manière préférée ils

comprennent un autre transgène codant pour une chaîne J humaine, de manière encore plus préférée il s'agit de souris transgéniques. De tels mammifères non-humains transgéniques sont humanisés à la fois pour la production d'IgA et pour une protéine qui s'associe aux IgA, la chaîne J.

5 L'invention englobe les animaux transgéniques issus de n'importe quelle espèce de mammifère.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, ledit mammifère non-humain transgénique est une souris transgénique.

10 L'invention englobe notamment une lignée de souris double-transgénique, dénommée lignée HAMIGA pour « Humanized Antibodies Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A », comprenant :

- un locus IgH modifié par remplacement de la séquence de commutation S $\mu$  par le gène C $\alpha$ 1 d'une immunoglobuline humaine de classe A, et
  - un gène V $\kappa$  complet comprenant le gène V $\kappa$ I réarrangé avec un
- 15 gène J $\kappa$ 5, l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$  et le gène C $\kappa$ , sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la chaîne lourde humaine (pVH), de l'activateur intronique E $\mu$  en amont, et du palindrome *hs3a/hs1,2/hs3b* en aval.

20 Les animaux de cette lignée double-transgénique produisent des IgA partiellement humanisées pour la chaîne lourde et totalement humanisées pour ce qui concerne la chaîne légère.

En effet, l'expression de la chaîne kappa transgénique dans cette lignée est capable d'entraîner l'exclusion allélique, c'est-à-dire d'empêcher dans la plupart des cellules B transgéniques, l'expression des gènes endogènes de chaînes légères d'immunoglobulines murines.

25 Le répertoire de réponse aux antigènes de cette lignée de souris est normal étant donné que c'est essentiellement le domaine VH de la chaîne lourde qui contribue à la formation du site anticorps. Or, la chaîne lourde transgénique  $\alpha$  humaine bénéficie d'un répertoire totalement diversifié puisque correspondant au répertoire normal généré par les réarrangements des segments VH, D et JH du locus IgH murin,

30 comme précisé ci-dessus.

En outre, les souris de cette lignée transgénique sont capables de produire des anticorps de forte affinité en réponse secondaire à l'antigène, du fait que

leurs lymphocytes B peuvent recruter le phénomène d'hypermutation somatique, à la fois au niveau du gène de la chaîne lourde et du transgène de chaîne légère kappa.

Les animaux transgéniques selon l'invention sont obtenus par les procédés classiques de transgénèse animale, selon les protocoles standards tels que décrits dans *Transgenic Mouse: Methods and Protocols ; Methods in Molecular Biology, Clifton, N.J., Volume. 209, Octobre 2002. Edité par : Marten H. Hofker, Jan Van Deursen, Martern H. Hofker et Jan Van Deursen. Publié par Holly T. Sklar ; Humana Press.*

Les séquences des gènes humains et murins d'immunoglobulines qui servent à la construction des animaux transgéniques selon l'invention sont connues et accessibles dans les bases de données. Par exemple, la séquence des exons CH1, CH2 et CH3 et de l'exon de membrane du gène Cα1 humain correspondent respectivement aux numéros d'accès J00220 et M60326 dans la base de données Genbank/EMBL.

La construction du gène Vκ est telle que décrite dans Chauveau et al., *Gene*, 1998, 222, 279-285 ; la séquence du gène VκI réarrangé avec le gène Jκ5 et le gène Cκ correspond à la séquence présentant le numéro d'accès X64133 dans la base de données EMBL/Genbank, qui code pour une chaîne légère humaine présentant la séquence correspondant au numéro d'accès CAA45494 dans la base de données EMBL.

Les insertions de fragments géniques dans le génome des mammifères non-humains peuvent être réalisées de façon aléatoire, de préférence elles sont réalisées de façon ciblée, par recombinaison homologue avec un vecteur de ciblage approprié comprenant éventuellement des séquences de recombinaison d'une recombinaison site-spécifique comme les sites LoxP de la recombinaison Cre. Les inactivations ou délétions de fragments géniques dans le génome des mammifères non-humains sont réalisées par recombinaison homologue avec un vecteur de ciblage approprié comprenant éventuellement des séquences de recombinaison d'une recombinaison site-spécifique comme les sites LoxP de la recombinaison. Les animaux double-transgéniques sont obtenus par croisement d'animaux transgéniques pour la chaîne lourde alpha avec des animaux transgéniques pour la chaîne légère, tels que définis ci-dessus. Les animaux double-transgéniques sont éventuellement croisés avec des animaux transgéniques dont le locus endogène de la chaîne légère kappa

d'immunoglobulines a été inactivé par recombinaison homologue et/ou avec des animaux dont le locus endogène de la chaîne J d'immunoglobulines a été inactivé et qui possèdent de surcroît un transgène J humain, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un vecteur de ciblage  
5 de recombinaison homologue, caractérisé en ce qu'il comprend le gène C $\alpha$  d'une immunoglobuline humaine de classe A ou un segment de ce gène incluant au moins l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane, flanqué des fragments de séquences du locus IgH d'un mammifère non-humain qui sont adjacents à la séquence S $\mu$ .

10 Selon un mode de réalisation avantageux dudit vecteur de ciblage, il comprend une cassette d'expression d'un marqueur de sélection approprié, adjacente audit gène C $\alpha$  ou au segment dudit gène tel que défini ci-dessus.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ladite cassette d'expression est flanquée de séquences de recombinaison site-spécifique. De  
15 préférence, lesdites séquences sont les séquences LoxP de la recombinaise Cre. Cette disposition permet éventuellement d'exciser ladite cassette d'expression.

Selon un autre mode de réalisation dudit vecteur de ciblage, lesdits fragments de séquences qui sont adjacents à la séquence S $\mu$  sont d'origine murine.

Selon un autre mode de réalisation dudit vecteur de ciblage, le gène  
20 C $\alpha$  ou le segment dudit gène est flanqué en 5' d'un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région JH/E $\mu$  et en 3' d'un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région C $\mu$ , lesquels fragments correspondant respectivement aux positions 131281 à 136441 et 140101 à 145032 dans la séquence du chromosome 12 murin (numéro d'accès AC073553 dans la base de données EMBL/Genbank).

25 La présente invention a également pour objet des cellules embryonnaires d'un mammifère non-humain, modifiées par un vecteur de ciblage tel que défini ci-dessus.

Les dites cellules embryonnaires (cellules souches totipotentes) modifiées sont utiles pour l'obtention des mammifères transgéniques tels que définis  
30 ci-dessus ; elles sont injectées dans des blastocystes de mammifère, selon les techniques classiques de transgénèse animale.

La présente invention a également pour objet, l'utilisation d'un mammifère non-humain transgénique tel que défini ci-dessus pour la production d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps.

La présente invention a également pour objet un procédé de préparation d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un mammifère non-humain transgénique tel que défini ci-dessus avec un antigène d'intérêt,
- l'obtention par tout moyen approprié, d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, à partir du sérum, des sécrétions ou des lymphocytes B dudit mammifère non-humain transgénique.

Les mammifères non-humains transgéniques selon l'invention présentent l'avantage de permettre la production d'anticorps monoclonaux de classe IgA qui sont d'emblée des anticorps chimériques humanisés de classe IgA. Le procédé de production d'anticorps monoclonaux humanisés de classe IgA selon l'invention est donc plus simple, plus rapide et plus économique que les procédés de l'art antérieur puisqu'il ne nécessite pas d'étapes additionnelles de clonage des gènes desdits anticorps et de fusion des domaines variables desdits anticorps avec les domaines constants d'immunoglobulines humaines.

L'invention englobe la production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux constitués par des IgA monomériques, dimériques et des s-IgA, ainsi que de leurs fragments, notamment les fragments Fab, Fab'2 et Fc.

Les anticorps humanisés de classe IgA tels que définis ci-dessus et leurs fragments sont préparés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que celles décrites dans *Antibodies : A Laboratory Manual*, E. Howell and D Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

De manière plus précise :

- les anticorps polyclonaux sont préparés par immunisation d'un mammifère non humain transgénique tel que défini ci-dessus avec un antigène d'intérêt, éventuellement couplé à la KLH ou à l'albumine et/ou associé à un adjuvant approprié tel que l'adjuvant de Freund (complet ou incomplet) ou l'hydroxyde d'alumine ; après obtention d'un titre en anticorps satisfaisant, les anticorps sont

récoltés par prélèvement du sérum des animaux immunisés et enrichis en IgA par précipitation, selon les techniques classiques, puis les IgA spécifiques sont éventuellement purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne appropriée sur laquelle est fixé l'antigène tel que défini ci-dessus, de façon à obtenir une préparation  
5 d'IgA monospécifiques.

- les anticorps monoclonaux sont produits à partir d'hybridomes obtenus par fusion de lymphocytes B d'un mammifère non-humain transgénique tel que défini ci-dessus avec des myélomes, selon la technique de Köhler et Milstein (Nature, 1975, 256, 495-497) ; les hybridomes sont cultivés *in vitro*, notamment dans  
10 des fermenteurs ou produits *in vivo*, sous forme d'ascite ; alternativement, lesdits anticorps monoclonaux sont produits par génie génétique comme décrit dans le brevet américain US 4,816,567. Par exemple, des mammifères non-humains transgéniques tels que défini ci-dessus sont immunisés de façon forte et répétée avec des antigènes choisis (antigènes de bactéries, de virus, de champignons, antigènes spécifiques de  
15 tumeurs tels que l'antigène carcino-embryonnaire, etc...), selon un protocole standard comprenant une première immunisation par injection intrapéritonéale de l'antigène dans un volume équivalent d'adjuvant complet de Freund puis une deuxième immunisation (rappel) 15 jours plus tard dans des conditions identiques mais avec cette fois de l'adjuvant incomplet de Freund. Les anticorps monoclonaux sont produits  
20 selon un protocole standard comprenant le sacrifice des animaux deux semaines après le dernier rappel, le prélèvement de la rate, la mise en suspension des lymphocytes spléniques et la fusion de ces lymphocytes avec la lignée cellulaire SP2/0 (cette lignée murine ne produit aucun anticorps murin, est immortalisée, et possède toute la machinerie de sécrétion nécessaire à la sécrétion d'immunoglobulines).

- les fragments d'anticorps sont produits à partir des régions  $V_H$  et  $V_L$  clonées, à partir des ARNm d'hybridomes ou de lymphocytes spléniques d'un mammifère non-humain transgénique selon l'invention, immunisé ; par exemple, les fragments Fv ou Fab sont exprimés à la surface de phages filamenteux selon la technique de Winter et Milstein (Nature, 1991, 349, 293-299) ; après plusieurs étapes  
30 de sélection, les fragments d'anticorps spécifiques de l'antigène sont isolés et exprimés dans un système d'expression approprié, par les techniques classiques de clonage et d'expression d'ADN recombinant.

Les anticorps ou leur fragments tels que définis ci-dessus, sont purifiés par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, telles que la chromatographie d'affinité.

La présente invention a également pour objet, un anticorps humanisé  
5 de classe IgA susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde chimérique dont le(s) domaine(s) constant(s) sont d'origine humaine et une chaîne légère humaine dont le domaine variable est codé par V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5.

L'invention englobe les anticorps humanisés de classe IgA dont la  
10 chaîne légère est codée par le gène V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5 présentant la séquence EMBL/Genbank X64133 ou une séquence produite par hypermutation de cette séquence, notamment après activation des lymphocytes B en présence de l'antigène.

La présente invention a également pour objet, un fragment d'un anticorps humanisé de classe IgA susceptible d'être obtenu par le procédé tel que défini  
15 ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment desdites chaînes lourdes et légères telles que définies ci-dessus.

L'invention englobe les anticorps polyclonaux, les anticorps monoclonaux ainsi que leurs fragments (Fab, Fc, Fab'2).

Les anticorps humanisés selon l'invention et leurs fragments tels  
20 que définis ci-dessus, sont bien tolérés chez l'Homme (minimisation du risque de réaction allergique par immunisation inter-espèce) et possèdent une demi-vie prolongée chez l'Homme, étant donné que la région constante de la chaîne lourde et la totalité de la chaîne légère de ces anticorps sont d'origine humaine.

La présente invention a également pour objet un médicament  
25 comprenant un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-dessus ; un tel anticorps ou son fragment est notamment utilisé en immunothérapie passive (sérothérapie) pour la prévention et le traitement d'une maladie infectieuse ou du cancer.

La présente invention a également pour objet une composition  
30 immunogène ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à un antigène, de préférence sous la forme d'un complexe antigène-anticorps



comprenant un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps dirigé contre ledit antigène ; une telle composition permet à la fois de cibler l'antigène vers l'épithélium des muqueuses et de le protéger de la protéolyse.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-dessus, associé par tout moyen approprié à un principe actif ; une telle composition permet à la fois de cibler le principe actif vers l'épithélium des muqueuses et de le protéger de la protéolyse.

Selon un mode de réalisation avantageux des compositions selon l'invention, elles contiennent en outre, au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement des substances porteuses et/ou des adjuvants.

Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

Les adjuvants sont avantageusement choisis dans le groupe constitué par des émulsions huileuses, de la saponine, des substances minérales, des extraits bactériens, de l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par des liposomes unilamellaires, des liposomes multilamellaires, des micelles de saponine ou des microsphères solides de nature saccharidique ou aurifère.

Les compositions selon l'invention, sont administrées par voie générale (orale, intramusculaire, sous-cutané, intra-péritonéale ou intraveineuse) ou par voie locale (oculaire, nasale, vaginale, rectale) ; la dose et le rythme d'administration varient en fonction de l'espèce (humaine ou animale) et de la maladie à traiter.

La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic comprenant un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-

dessus, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et au traitement des maladies infectieuses et du cancer.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un anticorps humanisé de classe IgA ou un fragment de cet anticorps, tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un réactif destiné au diagnostic des maladies infectieuses et du cancer.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples d'obtention et d'utilisation des mammifères non-humains transgéniques selon la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre la structure du locus IgH modifié obtenu par recombinaison homologue entre le locus IgH murin et le vecteur de ciblage dénommé p-alpha1KI, comprenant un fragment de 5,5 kb du gène alpha 1 humain incluant trois exons codant pour les domaines constants CH1, CH2 et CH3 et l'exon de membrane (mb) et une cassette néo bordée de sites LoxP (fragment de 1,6kb), flanqués en amont d'un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région JH-E $\mu$  (fragment DQ 52/JH) et en aval d'un autre fragment d'environ 5 kb correspondant au gène C $\mu$  (fragment C $\mu$ ).

- la figure 2 illustre la structure détaillée du vecteur de ciblage dénommé p-alpha1KI, comprenant : un fragment de 5,5 kb du gène alpha 1 humain incluant trois exons codant pour les domaines constants CH1, CH2 et CH3 et l'exon de membrane (mb) et une cassette néo bordée de sites LoxP (fragment de 1,6kb), flanqués en amont d'un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région JH-E $\mu$  (fragment DQ 52/JH) et en aval d'un autre fragment d'environ 5 kb correspondant au gène C $\mu$  (fragment C $\mu$ ).

- la figure 3 illustre la confirmation de la séquence du vecteur de ciblage p-alpha1KI par restriction enzymatique avec Xho I.  $\lambda$ H3 : marqueur de poids moléculaire. Pistes 3 et 4 : clones comprenant la cassette néo insérée dans la bonne orientation ; 5 fragments dont 2 co-migrent (5 kb et 5,3 kb) sont détectés : 6,4 kb (fragment CH2 + CH3 d' $\alpha$ 1-cassette néo), 5 kb (fragment C $\mu$ ), 5,3 kb (fragment JH + fragment CH1 d' $\alpha$ 1) et 3,7 kb (fragment plasmidique + fragment 5' DQ52). Piste 5 :

clone comprenant la cassette néo insérée en orientation inverse ; 4 fragments sont détectés : 9,5 kb (fragment JH -fragment CH2 + CH3 d' $\alpha$ 1-cassette néo), 5 kb (fragment C $\mu$ ), 3,7 kb (fragment plasmidique+ fragment 5' DQ52) et 2,4 kb (fragment CH1 d' $\alpha$ 1 + cassette néo).

5 - la figure 4 illustre le profil en Southern-blot d'un allèle recombinant, par comparaison avec un allèle sauvage ; l'ADN génomique digéré par Eco RI est hybridé avec une sonde située en 5' du gène  $\delta$ .

- la figure 5 illustre l'analyse par Southern-blot de l'ADN génomique des clones ES transfectés avec le vecteur de ciblage p-alpha1KI ; l'ADN  
10 génomique digéré par Eco RI est hybridé avec une sonde correspondant à la région 5' du gène  $\delta$ . La flèche indique un clone ayant intégré le transgène  $\alpha$ 1 humain par recombinaison homologue (fragment de 7,5 kb correspondant à l'allèle recombinant et fragment de 12 kb correspondant à l'allèle sauvage).

- la figure 6 illustre l'analyse par cytométrie de flux de l'expression  
15 d'un récepteur membranaire de la classe des IgA humaines à la surface des lymphocytes périphériques des animaux homozygotes de la lignée transgénique alpha1KI. L'axe des abscisses représente le marquage avec un anticorps anti- $\alpha$ 1 humain marqué à la fluorescéine et l'axe des ordonnées représente le marquage avec un anticorps anti-CD19 murin marqué à la phyco-érythrine. Le rectangle en pointillé  
20 indique les cellules exprimant à la fois CD19 (cellules B) et une chaîne lourde  $\alpha$ 1 humaine.

- la figure 7 illustre l'analyse en cytométrie de flux, de l'expression de la chaîne légère kappa humaine à la surface des lymphocytes B périphériques des souris de la lignée kappa ARN, par comparaison avec des souris non-transgéniques  
25 (contrôle). L'axe des abscisses représente le marquage avec un anticorps anti-kappa humain marqué à la fluorescéine et l'axe des ordonnées représente le marquage avec un anticorps anti-kappa murin marqué à la phycoérythrine.

- la figure 8 illustre l'hypermutation somatique du transgène kappa humain dans la lignée de souris transgéniques  $\kappa$  ARN ; la distribution des mutations le  
30 long de la chaîne légère kappa humaine de 40 clones isolées à partir de cellules B activés par la PNA a été analysée. Les mutations générant une substitution d'acides

aminés, les mutations silencieuses et les mutations générant un codon stop sont indiquées respectivement par ■, □, et ▣. Les acides aminés correspondant aux points d'hypermuation sont indiqués par leur nature et leur position, ainsi que par la position de la mutation dans le codon (en chiffre romain, entre parenthèse).

- 5 - la figure 9 illustre l'analyse en ELISA de la réponse en anticorps IgA1 chimériques humaines spécifiques, chez les souris doubles-transgéniques de la lignée HAMIGA immunisées avec l'antigène ovalbumine. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires d'IgA anti-ovalbumine.

**Exemple 1 : Obtention et caractérisation de la lignée transgénique alpha1KI (alpha1 Knock-In) exprimant une chaîne lourde alpha 1 d'immunoglobuline humaine, chimérique**

Le gène alpha 1 humain, incluant les trois exons codant pour les domaines constants CH1, CH2 et CH3 et l'exon de membrane (mb), a été inséré par recombinaison homologue, en lieu et place de la région de commutation S $\mu$  de la chaîne lourde murine (S $\mu$ ), de façon à bloquer la commutation de classe vers les gènes constants d'immunoglobulines situés en aval de C $\mu$  sur le locus endogène (locus IgH murin, figure 1). La région ciblée abolit l'expression du gène  $\mu$  endogène responsable de la synthèse de chaînes lourdes d'IgM, et diminue fortement celle des autres gènes de chaînes lourdes d'immunoglobulines. En conséquence, la lignée transgénique obtenue produit une forte quantités d'IgA chimériques dont le domaine constant humanisé correspond à l'isotype IgA1.

**1) Construction du vecteur de ciblage de la recombinaison homologue**

Les constructions plasmidiques ont été réalisées à partir du plasmide bluescript SK (pSK) (STRATAGENE) et de la souche bactérienne *E. coli* TG1(STRATAGENE), en utilisant les protocoles classiques de préparation, de clonage et d'analyse de l'ADN tels que ceux décrits dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Le vecteur de recombinaison homologue ou vecteur de ciblage dérivé de pSK, dénommé p-alpha1KI (figure 2), comprend : un fragment de 5,5 kb du gène alpha 1 humain incluant trois exons codant pour les domaines constants CH1, CH2 et CH3 et l'exon de membrane (mb) et une cassette néo (fragment de 1,6kb),

flanqué en amont d'un fragment d'environ 5 kb correspondant à la région JH-E $\mu$  (fragment DQ 52/JH) et en aval d'un autre fragment d'environ 5 kb correspondant au gène C $\mu$  (fragment C $\mu$ ).

De manière plus précise, les différents fragments ont été insérés  
5 dans le plasmide bluescript SK, selon les étapes suivantes :

Dans une première étape, le fragment C $\mu$  correspondant aux positions 140101 à 145032 du chromosome 12 murin (Genbank/EMBL AC073553) a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques appropriées puis cloné au site *Xho I* de pSK pour donner le plasmide pA.

10 Dans une seconde étape, le fragment DQ 52/JH correspondant aux positions 131281 à 136441 du chromosome 12 murin (Genbank/EMBL AC073553) a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces spécifiques appropriées puis cloné en 5' du fragment C $\mu$ , entre les sites *EcoR V* et *Cla I* du plasmide pA, pour donner le plasmide pB.

15 Dans une troisième étape, la cassette néo décrite dans Pinaud et al., Immunity, 2001, 15, 187-199, a été insérée au site *Sal I* entre DQ52/JH et C $\mu$ , pour donner le plasmide pC.

Le fragment Sac I-Bam HI de 5,5 kb d'un plasmide recombinant comprenant la totalité du gène alpha 1 humain, incluant les séquences des exons CH1, CH2 et CH3 (Genbank/EMBL J00220) et de l'exon de membrane (Genbank/EMBL X64133) a été ligaturé à chacune de ses extrémités avec des adaptateurs *Cla I*.  
20

Enfin, dans une dernière étape, le fragment de 5,5 kb flanqué d'adaptateurs *Cla I* ainsi obtenu a été inséré entre le fragment JH et la cassette néo au site *Cla I* du plasmide pC pour donner le vecteur de ciblage dénommé p-alpha1KI.

25 La séquence de p-alpha1KI a été vérifiée par séquençage automatique et par analyse de restriction avec les enzymes *Cla I* et *Xho I* (figure 3).

## 2) Transfection de cellules ES et injection dans des blastocystes

Les clones de cellules ES issues de la lignée 129/SJ ont été isolés, analysés puis injectés dans des blastocystes de souris C57/Black 6, en utilisant les  
30 protocoles classiques de transgénèse et d'analyse de l'ADN génomique, tels que ceux décrits dans et dans Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

De manière plus précise, des cellules ES ont été transfectées par électroporation de l'ADN de p- $\alpha$ 1KI linéarisé au site *Not I*. Les clones sélectionnés en présence de généticine ont été prélevés et l'ADN génomique digéré par *EcoR I* a été analysé par Southern Blot à l'aide d'une sonde radioactive s'hybridant en dehors  
 5 du site de recombinaison homologue, en 5' du gène constant Delta ( $\delta$ ) et de son site *EcoR I* (figure 4) ; cette sonde amplifiée par PCR à l'aide d'amorces spécifiques appropriées, correspond aux positions 140101 à 145032 de la séquence du chromosome 12 murin (EMBL/Genbank AC073553).

La présence d'un allèle recombinant est visualisée par un fragment  
 10 d'environ 7,5 kb (représentant le fragment  $\mu$  murin et la cassette néo) alors que l'allèle sauvage correspond à un fragment de 12 kb (figure 5). Dans ces conditions, sur 303 clones analysés, 4 se sont révélés positifs.

La vérification du caryotype de deux des quatre clones recombinants n'a montré aucune anomalie chromosomique (aneuploïdie).  
 15 Ces clones ont été injectés dans des blastocystes de souris C57/Black 6 en utilisant les protocoles classiques de transgénèse tels que ceux décrits dans *Transgenic Mouse: Methods and Protocols*, précité. Parmi les souris obtenues, celles présentant le degré de chimérisme le plus élevé ont été analysées par PCR et par ELISA. Une lignée de souris homozygotes pour le locus IgH recombiné, dénommée ci-après lignée alpha 1  
 20 *knock-in* ou *alpha1KI*, a ensuite été obtenue par croisement des animaux hétérozygotes présentant le degré de chimérisme le plus élevé.

### 3) Détection du locus IgH recombiné portant le gène C $\alpha$ 1 humain (allèle alpha 1 *knock-in* ou *alpha1KI*) et du locus IgH sauvage (allèle $\mu$ sauvage) par PCR

L'ADN génomique d'un échantillon de queue des animaux homo-  
 25 zygotés obtenus comme précisé ci-dessus, a été analysé par PCR à l'aide des deux couples d'amorces suivants :

- couple spécifique du locus IgH murin non muté (allèle  $\mu$  sauvage) :
- *amorce UpstreamSpe I Smu* : 5' GAG TAC CGT TGT CTG GGT CAC 3' (SEQ ID NO:1)
- 30 - *amorce SacI-3'Imu* : 5' GAG CTC TAT GAT TAT TGG TTA AC 3' (SEQ ID NO:2)

La réaction d'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation de 61°C. Cette PCR amplifie en 30 cycles un fragment de 91 paires de bases-encadrant le site Spe I-spécifique du locus IgH murin non muté.

- couple spécifique du locus IgH recombiné portant le gène Cα1

5 humain (allèle alpha 1 *knock-in* ou *alpha1KI*) :

- amorce Neo1 : 5' GCA TGA TCT GGA CGA AGA GCA T 3' (SEQ ID NO:3)

- amorce Neo2 : 5' TCC CCT CAG AAG AAC TCG TCA A 3' (SEQ ID NO:4)

La réaction d'amplification a été réalisée avec une température d'hybridation de 55°C. Cette PCR amplifie en 30 cycles un fragment de 120 paires de  
10 bases spécifique du locus IgH recombiné portant le gène Cα1 humain (mutation alpha 1 *knock-in* ou *alpha1KI*).

Une lignée de souris homozygotes pour la mutation *alpha1KI*, dénommée ci-après lignée alpha 1 *knock-in* ou *alpha1KI* a été établie ; les animaux de cette lignée sont systématiquement et simultanément négatifs en PCR avec les  
15 amorces spécifiques de l'allèle μ sauvage et positifs en PCR avec les amorces spécifiques de l'allèle alpha 1 *knock-in*.

#### 4) Dosage des IgA sériques totales en néphélobimétrie et en ELISA

##### a) néphélobimétrie

Les IgA sériques ont été dosées par néphélobimétrie sur un automate  
20 BNII™ (BEHRING) en utilisant le kit de dosage des IgA (BEHRING), selon les recommandations du fournisseur.

Le dosage des IgA sériques a donné des résultats totalement corrélés avec ceux du génotypage réalisé par PCR :

- les animaux contrôle non mutants ont un taux nul d'immunoglobulines humaines de  
25 classe IgA
- les animaux hétérozygotes α1-KI ont également un taux indétectable d'IgA humaines et un taux normal d'IgM murines.
- les animaux homozygotes α1-KI ont un taux significatif d'IgA humaines, ce taux variant entre 0,4 et 0,6 g/l dans le sérum. Par contre, les IgM murines sont  
30 indétectables dans le sérum de ces animaux.

b) ELISA

Les résultats obtenus en néphélométrie ont été confirmés en ELISA suivant les étapes suivantes : des plaques à 96 puits (Maxisorb™, NUNC) ont été recouvertes, soit d'anticorps non marqué anti-IgA humaines, soit d'anticorps non-  
 5 marqué anti-IgM murines, par incubation une nuit à + 4° C en présence de Fab'2 de chèvre anti-IgA humaines ou anti-IgM murines (Southern Biotechnologies Associates), dilués au 1/500<sup>ème</sup> en tampon carbonate 0,1 M, pH 8,3 (100 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween (PBS-Tween 0,1%), les plaques ont été saturées en présence de PBS contenant 10 %  
 10 de sérum de veau fœtal (100 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les sérums à tester, dilués au 1/100<sup>ème</sup> et au 1/500<sup>ème</sup> en tampon PBS contenant 10% sérum de veau fœtal ont été ajoutés (100 microlitres/puits) et les plaques ont été incubées 3 heures à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, un antisérum anti-IgA humaines marqué à la phosphatase alcaline ou un  
 15 sérum anti-IgM murines marqué à la phosphatase alcaline (Biosys) dilués au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween 0,1% (100 microlitres/puits) ont été ajoutés et les plaques ont été incubées 1 heure à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les IgA et les IgM fixées ont été révélées par addition de substrat de la phosphatase alcaline (p-nitrophenylphosphate, SIGMA) à 1 mg/ml en tampon Tris  
 20 0,2M, pH 7,0. La réaction a été bloquée par addition de soude 0,5N (50 microlitres/puits) puis l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 405 nm.

Les données quantitatives sont obtenues par extrapolation avec une gamme d'un sérum étalon (BEHRING) pour le dosage des IgA humaines, et d'une IgM monoclonale murine (SOUTHERN BIOTECHNOLOGIES ASSOCIATES) pour  
 25 le dosage des IgM murines.

Le dosage des IgA sériques en ELISA montre une différence significative entre les homozygotes et les hétérozygotes ; les sérums d'homozygotes contiennent 0,4 et 0,6 g/l d'IgA1, alors que des valeurs d'absorbance nulles ou très faibles sont observées pour les sérums d'hétérozygotes même à la dilution la plus  
 30 faible (au 1/100<sup>ème</sup>). A l'inverse lorsque les IgM murines sont dosées en ELISA, on observe un taux normal d'IgM murines (de l'ordre de 1 g/l) chez les souris contrôles « non mutantes » de même que chez les animaux hétérozygotes pour la mutation  $\alpha 1$ -



KI. Par contre, le taux des IgM murines est nul chez les animaux homozygotes pour la mutation  $\alpha 1$ -KI.

### **5) Recherche de l'expression d'un récepteur membranaire de la classe des IgA humaines à la surface des lymphocytes périphériques des animaux mutants**

5 Les animaux homozygotes porteurs de la mutation  $\alpha 1$ -KI ont été phénotypés en cytométrie de flux, par double marquage à l'aide d'anticorps spécifiques d'IgA1 humaine ou d'IgM murines marqués à la fluorescéine, et d'anticorps spécifiques des cellules B (anticorps anti-CD19) marqués à la phycoérythrine. De manière plus précise :

10 - Préparation des cellules lymphoïdes : deux organes lymphoïdes périphériques : la rate et les plaques de Peyer, ont été prélevés séparément chez les animaux mutants homozygotes  $\alpha 1$ KI, dilacérés en tampon versène (Invitrogen), et filtrés sur tamis (40 microns) afin d'obtenir une suspension de cellules individuelles débarrassée des agrégats cellulaires. Les cellules spléniques ont alors été centrifugées  
15 et soumises à une étape supplémentaire de choc osmotique afin de lyser les globules rouges par remise en suspension du culot cellulaire dans 1 ml d'eau distillée. Les cellules des échantillons ont ensuite été immédiatement remises en suspension dans du milieu complet (RPMI + 10% sérum de veau fœtal), dénombrées et conservées sur de la glace.

20 - Marquage à l'aide d'anticorps fluorescents :  $10^5$  cellules de chaque échantillon ont été incubées pendant 30 minutes à 4° C avec une dilution au 1/100<sup>ème</sup>, soit d'un anticorps anti-IgM de souris marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Southern Biotechnologies), soit d'un anticorps anti-IgA humaines marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, ou bien avec la combinaison d'un des anticorps  
25 précédents avec un anticorps spécifique des cellules B (anticorps anti-CD19) marqué à la phycoérythrine (double marquage). Les cellules ont ensuite été lavées dans 5 ml de PBS puis le surnageant a été décanté et les cellules ont été remises en suspension dans 100 microlitres de PBS, 0,5% BSA, 0,1 mM EDTA.

- Analyse en cytofluorimétrie : les cellules marquées ont été  
30 analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (COULTER XL™).

Les résultats de la cytométrie de flux sont en accord avec ceux du dosage des immunoglobulines sériques. Chez les animaux homozygotes de la lignée

alpha1-KI, aucune expression d'IgM murines n'est détectée, ni dans la rate, ni dans les plaques de Peyer.

Pourtant en l'absence d'expression d'IgM, un compartiment de cellules B périphériques CD19<sup>+</sup> est capable de se différencier chez ces animaux et  
 5 représente 10 à 12 % des lymphocytes spléniques ou 40 à 60% des lymphocytes des plaques de Peyer. Ce compartiment exprime des IgA membranaires dont la chaîne lourde humanisée est reconnue par un anticorps spécifique des IgA1 et marqué à la fluorescéine (figure 6).

**Exemple 2 : Obtention et caractérisation de la lignée transgénique  $\kappa$  ARN**  
 10 exprimant une chaîne légère kappa d'immunoglobuline humaine

Une lignée d'animaux transgéniques exprimant dans toutes leurs cellules B, une chaîne légère kappa humaine codée par la région variable V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5 et la région C $\kappa$  (chaîne kappa ARN, EMBL/Genbank X64133), a été obtenue par transgénèse directe, à partir du vecteur d'expression décrit dans Chauveau et al, Gene,  
 15 1998, 222, 279-285.

**1) Construction du vecteur de transgénèse**

Le vecteur de transgénèse est le plasmide pALIE $\mu$  décrit dans Chauveau et al, Gene, 1998, 222, 279-285 ; il contient à la fois le promoteur V $\kappa$ H et l'enhancer E $\mu$  en 5' de la cassette codant pour la chaîne kappa ARN, et en 3' de cette  
 20 cassette : les trois enhancer hs3a, hs12 et hs3b, situés en 3' du locus IgH en 3'. La séquence codante correspond à la chaîne V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5-C $\kappa$  (Genbank/EMBL X64133). Le plasmide pALIE $\mu$  a été linéarisé par les enzymes de restriction *Not I* et *Pvu I* qui coupent à l'intérieur de la séquence plasmidique, *Not I* étant situé en amont du promoteur qui précède le segment V $\kappa$  cloné et *Pvu I* étant situé au sein du gène de résistance  
 25 à l'ampicilline porté par le plasmide. Le fragment incluant l'ensemble de la cassette d'expression kappa flanquée de tous les éléments promoteurs et régulateurs de l'expression a ensuite été inséré de façon aléatoire dans des blastocystes de souris en utilisant les protocoles classiques de transgénèse directe tels que ceux décrits dans *Transgenic Mouse: Methods and Protocols*, précité.

## 2) Identification des animaux fondateurs de la lignée $\kappa$ ARN et typage de leur descendance

Une lignée de souris transgénique possédant le transgène  $\kappa$  ARN a été obtenue après injection du vecteur d'expression ; la présence de ce transgène humain a été vérifiée sur l'ADN des souris par Southern blot à l'aide d'une sonde spécifique de la région C $\kappa$  humaine (fragment *EcoRI-EcoRI* de 2,5 kb incluant la totalité de l'exon C $\kappa$  humain). Les animaux portant l'insertion du transgène sur les deux allèles du point d'insertion (animaux homozygotes) ont une quantité double du transgène et peuvent être distingués par le Southern blot des animaux portant une seule copie du transgène (animaux hétérozygotes). Alternativement, la présence du transgène a été détectée par PCR à l'aide d'amorces permettant d'amplifier spécifiquement la séquence humaine V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5-C $\kappa$  (Genbank/EMBL X64133).

## 3) Recherche de l'expression des chaînes légères kappa humaines à la surface des lymphocytes périphériques des souris de la lignée kappa ARN

Les animaux dizygotes porteurs du transgène kappa ARN ont été phénotypés en cytométrie de flux, par double marquage à l'aide d'un anticorps anti- $\kappa$  murin (marqué à la phycoérythrine) en conjonction avec un anticorps anti- $\kappa$  humain (marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine), selon le protocole tel que décrit à l'exemple 1.

Ces animaux montrent une expression du transgène  $\kappa$  humain sur la majorité des cellules B (figure 7). De plus le transgène induit un phénomène d'exclusion allélique tel que les cellules B exprimant le transgène  $\kappa$  humain n'expriment pas de gène endogène de chaînes légères de souris. En cytométrie, ces cellules sont donc positives lors du marquage avec l'antisérum anti-chaînes  $\kappa$  humaines et négatives avec l'antisérum anti chaînes  $\kappa$  murines (figure 7).

## 4) Analyse de l'hypermutation somatique du transgène $\kappa$ chez les souris de la lignée kappa ARN

Il a également été montré que cette chaîne légère  $\kappa$  humaine est capable de s'associer avec des chaînes lourdes et de se diversifier grâce au phénomène d'hypermutation somatique (déclenché par une réponse à l'antigène). Ce transgène respectant l'architecture endogène d'un gène  $\kappa$  avec présence de l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$  entre

le V $\kappa$ J $\kappa$  et le C $\kappa$ , bénéficie en outre d'une expression forte assurée par la combinaison promoteur P<sub>VH</sub> / enhancer E $\mu$  + palindrome régulateur 3'IgH (hs3a, hs1,2, hs3b). L'action cumulative de tous ces éléments régulateurs permet de recruter la machinerie d'hypermutation somatique au niveau du transgène. De manière plus précise, les

5 plaques de Peyer des souris transgéniques sont prélevées par dissection de l'intestin. La suspension cellulaire est préparée en broyant les plaques de Peyer à travers une membrane de nylon. Les cellules sont lavées trois fois à + 4° C, dans du DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal. Les cellules mortes ont été éliminées après chaque lavage et la suspension cellulaire a été ajustée à 10<sup>6</sup> cellules/ml.

10 Les cellules ont été incubées 30 min à + 4° C en présence d'anticorps anti-B220 biotinylé. Après deux lavages avec du DMEM contenant 5 % de sérum de veau fœtal, les cellules ont été incubées 30 min à + 4° C en présence de streptavidine couplée à la phycoérythrine, puis lavées et remises en suspension dans du PBS contenant 5 % de sérum de veau fœtal. Après addition d'une lectine spéci-

15 fique des cellules B activées (PNA pour *peanut agglutinin*) conjuguée à la FITC, la a suspension cellulaire a été incubée 30 min à + 4° C. Après deux lavages avec du DMEM, les cellules ont été remises en suspension dans du DMEM puis elles B ont ensuite été triées, par cytométrie en flux, en deux populations : B220<sup>+</sup>PNA<sup>high</sup> (B acti-

20 vées) et B220<sup>+</sup>PNA<sup>low</sup> (B au repos).

L'ADN génomique a été extrait des deux populations cellulaires triées à l'aide du kit QIAamp Tissue (QIAGEN). Une amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée sur 2 $\mu$ l d'ADN génomique en utilisant des amorces correspondant à la région signal du V $\kappa$ 1 humain (5'-AAGTCGACATGGACATGAGGGTGCC-3') (SEQ ID NO:5) et au début de la

25 région J $\kappa$ 5 humaine (5'-TTCTCGAGACTTAGGTTTAATCTCCAG-3') (SEQ ID NO:6). Le programme d'amplification consistait en : une étape initiale de dénaturation à 94°C pendant 5 min; suivi de 35 cycles alternant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s, une étape d'hybridation à 52°C pendant 30 s, et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s; puis une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7 min.

30 Le produit d'amplification a été purifié sur gel d'agarose à 1, 2%, élué (kit QIAquick Gel Extraction, QIAGEN) puis cloné dans le vecteur pCRII-TOPO (INVITROGEN). Les clones recombinants ont été testés par restriction enzymatique

puis purifiés (kit Flexiprep, PHARMACIA) et séquencés par la méthode de Sanger. Les réactions de séquençage ont été réalisées par PCR à l'aide des amorces M13 reverse et M13(-20) et de didésoxynucléotides fluorescents puis analysées par électrophorèse capillaire sur séquenceur automatique (ABI-PRISM 310, PERKIN-ELMER).

- 5 Les séquences obtenues à partir des cellules B activées ont ensuite été alignées avec la séquence originale du transgène non muté (Genbank/EMBL X64133). Le nombre et la position des mutations ont été analysés (figure 8).

Le transgène  $\kappa$  subit cette hypermutation somatique à un taux pratiquement aussi élevé (17 mutations pour 1000 bases) que les gènes  
10 d'immunoglobulines endogènes (qui mutent à un taux de 40 mutations pour 1000 bases). Ce transgène unique est donc capable de générer un « répertoire » kappa possédant une certaine diversité.

**Exemple 3 : Obtention et caractérisation de la lignée double-transgénique HAMIGA exprimant une chaîne lourde alpha 1 chimérique et une chaîne légère  
15 kappa d'immunoglobulines humaines.**

Le croisement des lignées  $\kappa$ ARN et alpha1-KI décrites aux exemples précédents, génère des souris doubles transgéniques  $\kappa$ ARN / alpha1-KI.

Pour ce faire, les animaux homozygotes pour la mutation alpha1-KI et homozygotes pour le transgène  $\kappa$  ARN ont été croisés entre eux. En première génération (F1) après ce croisement, tous les animaux obtenus sont hétérozygotes pour la  
20 mutation alpha1-KI et hétérozygotes pour le transgène  $\kappa$  ARN. Ces animaux F1 ont donc été à nouveau croisés : à la génération suivante (F2) les lois de la génétique Mendélienne permettent d'obtenir 1 animal sur 4 homozygote pour la mutation alpha1-KI et un animal sur 4 homozygote pour le transgène  $\kappa$  ARN. Parmi ces  
25 animaux F2, un animal sur 16 a donc pu être sélectionné comme portant à la fois la mutation alpha1-KI à l'état homozygote et comme portant le transgène  $\kappa$  ARN à l'état homozygote. Ces animaux sont les fondateurs de la lignée HAMIGA et ils transmettent de façon stable à leur descendance les gènes permettant simultanément la production d'une chaîne lourde alpha1 humanisée en remplacement de la production  
30 d'IgM murines ainsi que la production et la diversification par hypermutation d'une chaîne  $\kappa$  humaine.

Cette lignée de souris doubles transgéniques est dénommée lignée HAMIGA pour « *Humanized Antibodies Made Up Of Monoclonal Immunoglobulin A* ».

### 1) Obtention de la lignée double-transgénique HAMIGA

#### 5 a) présence du transgène $\kappa$

La transmission du transgène  $\kappa$  ARN au cours des croisements d'animaux transgéniques a été suivie par Southern Blot à l'aide d'une sonde spécifique de la région C $\kappa$  humaine (fragment *EcoRI-EcoRI* de 2,5 kb incluant la totalité de l'exon C $\kappa$  humain).

10 L'expression du transgène  $\kappa$  chez les animaux mutants a été détectée par dosage en ELISA de chaînes kappa libres humaines éliminées dans les urines des animaux. De manière plus précise : des plaques à 96 puits (Maxisorb®, NUNC) ont été incubées une nuit à + 4° C en présence d'un anticorps non marqué anti- $\kappa$  humain (Kallestad) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> en tampon carbonate 0,1 M pH 8,3 (100  
15 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween (PBS-Tween 0,1%), les plaques ont été saturées en présence de PBS contenant 10% sérum de veau foetal (100 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les échantillons d'urine à tester, dilués au 1/100<sup>ème</sup> et au 1/500<sup>ème</sup> en  
20 tampon PBS contenant 10% de sérum de veau foetal ont été ajoutés (100 microlitres/puits) et les plaques ont été incubées 3 heures à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, un antisérum anti- $\kappa$  humain marqué à la phosphatase alcaline (SIGMA) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween 0,1% (100 microlitres/puits) a été ajouté et les plaques ont été incubées 1 heure à 37°C. Après 3  
25 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les chaînes légères kappa humaines fixées ont été révélées par addition de substrat de la phosphatase alcaline (p-nitrophényl-phosphate, SIGMA) à 1 mg/ml en tampon Tris 0,2M, pH 7,0. La réaction a été bloquée par addition de soude 0,5N (50 microlitres/puits) puis l'absorption a été mesurée à une longueur d'onde de 405 nm.

Alternativement, l'expression du transgène kappa humain a été  
30 analysée par cytométrie de flux comme décrit à l'exemple 2. Les résultats montrent que la présence du transgène  $\kappa$  ARN entraîne un phénomène important d'exclusion

allélique, tel que parmi les lymphocytes périphériques plus de 50 % expriment la chaîne légère humaine et ne réarrangent donc pas les gènes de chaîne légères murines pour exprimer une chaîne légère murine.

**b) homozygotie pour la mutation  $\alpha 1$ -KI**

5 Le premier élément simple indiquant l'homozygotie  $\alpha 1$ -KI est la présence d'un taux élevé d'IgA1 humaines dans le sérum des animaux. En outre l'homozygotie a été confirmée en PCR par la positivité de la « PCR  $\alpha 1$ -KI » associée à la négativité de la « PCR allèle  $\mu$  sauvage ». Enfin, après sacrifice des animaux, l'analyse en cytométrie de flux a permis de montrer sur les lymphocytes de la rate et  
10 des plaques de Peyer que la totalité des lymphocytes B (CD19+) expriment des IgA1 humaines membranaire alors qu'en parallèle aucune cellule B n'exprime d'IgM murine.

**c) Vérification de la présence simultanée de la mutation  $\alpha 1$ -KI et du transgène  $\kappa$  ARN chez les animaux HAMIGA et leur descendance.**

15 Les animaux double-transgéniques HAMIGA ont été caractérisés comme ceux répondant simultanément aux deux spécificités décrites ci-dessus : présence du transgène  $\kappa$  ARN à l'état homozygote et homozygotie pour la mutation  $\alpha 1$ -KI. De plus, ces animaux se reproduisent en préservant ces deux spécificités et le phénotype de leur descendance possède les propriétés suivantes, simultanément et  
20 de façon stable :

- la production d'IgA1 humanisée à un taux conséquent (facilement vérifiable par ELISA ou néphélométrie sur un simple prélèvement de sang réalisé chez les animaux vivants au niveau du sinus rétro-orbitaire)

- la production de chaîne légère  $\kappa$  humaine (facilement vérifiable par  
25 ELISA sur un simple prélèvement d'urines réalisé chez les animaux vivants).

**2) Immunisation des animaux**

Les animaux ont été immunisés une première fois par injection intra-péritonéale de 10 microgrammes d'ovalbumine (SIGMA) diluée dans 100 microlitres de sérum physiologique et mise en émulsion avec 200 microlitres d'adjuvant complet  
30 de Freund (SIGMA).

Après 4 semaines, les animaux ont subi un rappel vaccinal par injection intra-péritonéale de 10 microgrammes d'ovalbumine (SIGMA) diluée dans 100 microlitres de sérum physiologique et mise en émulsion avec 200 microlitres d'adjuvant incomplet de Freund (SIGMA).

### 5 3) Dosage des anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal (ovalbumine)

La présence d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal ovalbumine a été analysée en ELISA, 4 semaines, puis 7 semaines après la deuxième injection de l'antigène, en suivant la technique suivante : des plaques à 96 puits (Maxisorb®, NUNC) ont été incubées une nuit à + 4° C en présence d'ovalbumine à la concentration de 10 microgrammes/ml en tampon carbonate 0,1 M pH 8,3 (100 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween (PBS-Tween 0,1%), les plaques ont été saturées en présence de PBS contenant 10% de sérum de veau fœtal (100 microlitres/puits). Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les échantillons de sérum à tester, dilués au 1/20<sup>ème</sup> et au 1/100<sup>ème</sup> en tampon PBS contenant 10% de sérum de veau fœtal ont été ajoutés (100 microlitres/puits) et les plaques ont été incubées 3 heures à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, un antisérum anti-IgA humaines marqué à la phosphatase alcaline (BIOSYS) dilué au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS-Tween 0,1% (100 microlitres/puits) a été ajouté et les plaques ont été incubées 1 heure à 37°C. Après 3 lavages avec du tampon PBS-Tween 0,1%, les chaînes légères kappa humaines fixées ont été révélées par addition de substrat de la phosphatase alcaline (p-nitrophenyl-phosphate, SIGMA) à 1 mg/ml en tampon Tris 0,2M, pH 7,0. La réaction a été bloquée par addition de soude 0,5N (50 microlitres/puits) puis l'absorption a été mesurée à une longueur d'onde de 405 nm. Le taux d'anticorps IgA anti-ovalbumine a été exprimé en unités arbitraires établies pour les sérums dilués au 1/100<sup>ème</sup> en fonction du rapport Densité optique sérum testé / Densité optique du sérum témoin.

Les résultats présentés à la figure 9 montrent la présence d'anticorps spécifiques de l'antigène vaccinal ovalbumine 4 semaines (taux des anticorps IgA1 humaines anti-ovalbumine à 388 unités), puis 7 semaines après la deuxième injection de l'antigène (taux des anticorps IgA anti-ovalbumine à 162 unités). En parallèle, il a également été vérifié qu'en l'absence d'immunisation des animaux, le taux des anticorps IgA anti-ovalbumine détectés restait inférieur à 30 unités.



Le répertoire de réponse aux antigènes de ces souris est attendu comme subnormal puisqu'on sait que c'est essentiellement le domaine VH de la chaîne lourde qui contribue à la formation du site anticorps (or la chaîne lourde transgénique  $\alpha 1$  humaine bénéficie d'un répertoire totalement diversifié puisque  
5 correspondant au répertoire normal généré par les réarrangements des segments VH, D et JH du locus IgH murin.). Ces souris sont capables de produire des anticorps de forte affinité en réponse secondaire, ce qui résulte du fait que leurs lymphocytes B peuvent recruter le phénomène d'hypermutation somatique à la fois au niveau du gène de chaîne lourde et du transgène de chaîne légère  $\kappa$  *ARN*.

10 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

15

### REVENDICATIONS

1°) Mammifère non-humain transgénique, caractérisé en ce qu'il comprend un locus IgH modifié par remplacement de la séquence de commutation  $S\mu$  par tout ou partie d'un transgène constitué par le gène  $C\alpha$  d'une immunoglobuline humaine de classe A incluant au moins l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane.

2°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est homozygote pour ledit locus IgH modifié.

3°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit locus IgH est modifié par remplacement de la séquence de commutation  $S\mu$ , par la totalité du gène  $C\alpha$ .

4°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que ledit locus IgH est modifié par remplacement de la séquence de commutation  $S\mu$ , par le segment du gène  $C\alpha$  incluant l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane.

5°) Mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ledit gène  $C\alpha$  est  $C\alpha 1$ .

6°) Mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend un autre transgène codant pour une chaîne légère d'immunoglobuline humaine.

7°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 6, caractérisé en ce que la dite chaîne légère est une chaîne kappa.

8°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 7, caractérisé en ce que ledit transgène comprend l'activateur intronique  $E\mu$  en amont et le palindrome *hs3a/hs1,2/hs3b* en aval.

9°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit transgène est sous le contrôle du promoteur de la chaîne lourde d'immunoglobulines humaine.

10°) Mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisé en ce qu'il est dizygote pour ledit transgène.

11°) Mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce qu'il possède un locus endogène de la chaîne kappa inactivé.

12°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est homozygote pour ledit locus endogène de la chaîne kappa inactivé.

13°) Mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'il possède un gène codant pour la chaîne J inactivé.

14°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il est homozygote pour ledit gène codant pour la chaîne J inactivé.

15°) Mammifère non-humain transgénique selon la revendication 13 ou la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend un autre transgène codant pour une chaîne J d'immunoglobuline humaine.

16°) Mammifère non-humain transgénique selon une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souris transgénique.

17°) Souris transgénique selon la revendication 16, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- un locus IgH modifié par remplacement de la séquence de commutation S $\mu$  par tout le gène C $\alpha$ 1 d'une immunoglobuline humaine de classe A, et
- un gène V $\kappa$  complet comprenant le gène V $\kappa$ I réarrangé avec un gène J $\kappa$ 5, l'intron J $\kappa$ -C $\kappa$  et le gène C $\kappa$ , sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la chaîne lourde humaine (pVH) et de l'activateur intronique E $\mu$  en amont, et du palindrome *hs3a/hs1,2/hs3b* en aval.

18°) Vecteur de ciblage de recombinaison homologue, caractérisé en ce qu'il comprend le gène C $\alpha$  d'une immunoglobuline humaine de classe A ou un segment de ce gène incluant au moins l'exon codant pour le domaine CH3 et l'exon de membrane, flanqué des fragments de séquences du locus IgH d'un mammifère non-humain qui sont adjacents à la séquence S $\mu$ .

19°) Vecteur de ciblage selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comprend une cassette d'expression d'un marqueur de sélection approprié, adjacent audit gène C $\alpha$  ou à un segment dudit gène.

20°) Vecteur de ciblage selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite cassette d'expression est flanquée de séquences de recombinaison site-spécifique.

21°) Vecteur de ciblage selon la revendication 19, caractérisé en ce que lesdites séquences sont les séquences LoxP de la recombinaise Cre.

22°) Vecteur de ciblage selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que lesdits fragments de séquences qui sont adjacents à la séquence Sp sont d'origine murine.

23°) Vecteur de ciblage selon la revendication 22, caractérisé en ce que le gène Cα ou le segment dudit gène est flanqué, respectivement en 5' et en 3', des fragments correspondants aux positions 131281 à 136441 et 140101 à 145032 dans la séquence du chromosome 12 murin (numéro d'accès AC073553 dans la base de données EMBL/Genbank).

24°) Cellule embryonnaire de mammifère non-humain, modifiée par un vecteur de ciblage selon l'une quelconque des revendications 18 à 23.

25°) Utilisation d'un mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou d'une souris transgénique selon la revendication 17, pour la production d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps.

26°) Procédé de préparation d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou d'une souris transgénique selon la revendication 17, et

- l'obtention par tout moyen approprié, d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, à partir du sérum, des sécrétions ou des lymphocytes B dudit mammifère non-humain transgénique.

27°) Anticorps humanisé de classe IgA susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde chimérique dont les domaines constants sont d'origine humaine et une chaîne légère humaine dont le domaine variable est codé par VκI-Jκ5.

20°) Vecteur de ciblage selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite cassette d'expression est flanquée de séquences de recombinaison site-spécifique.

21°) Vecteur de ciblage selon la revendication 19, caractérisé en ce que lesdites séquences sont les séquences LoxP de la recombinaise Cre.

22°) Vecteur de ciblage selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisé en ce que lesdits fragments de séquences qui sont adjacents à la séquence S $\mu$  sont d'origine murine.

23°) Vecteur de ciblage selon la revendication 22, caractérisé en ce que le gène C $\alpha$  ou le segment dudit gène est flanqué, respectivement en 5' et en 3', des fragments correspondants aux positions 131281 à 136441 et 140101 à 145032 dans la séquence du chromosome 12 murin (numéro d'accès AC073553 dans la base de données EMBL/Genbank).

24°) Cellule embryonnaire de mammifère non-humain, modifiée par un vecteur de ciblage selon l'une quelconque des revendications 18 à 23.

25°) Utilisation d'un mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou d'une souris transgénique selon la revendication 17, pour la production d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps.

26°) Procédé de préparation d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- l'immunisation d'un mammifère non-humain transgénique selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 ou d'une souris transgénique selon la revendication 17, et

- l'obtention par tout moyen approprié, d'anticorps humanisés de classe IgA ou de fragments de ces anticorps, à partir du sérum, des sécrétions ou des lymphocytes B dudit mammifère non-humain transgénique préalablement sacrifié.

27°) Anticorps humanisé de classe IgA susceptible d'être obtenu par le procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il comprend une chaîne lourde chimérique dont les domaines constants sont d'origine humaine et une chaîne légère humaine dont le domaine variable est codé par V $\kappa$ I-J $\kappa$ 5.

28°) Fragment d'un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend un fragment desdites chaînes lourdes et légères.

5 29°) Fragment d'anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il est sélectionné dans le groupe constitué par les fragments Fab, Fab'2 et Fc.

30°) Médicament, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29.

10 31°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29.

15 32°) Composition immunogène ou vaccinale, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29, associé à un antigène.

20 33°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29, associé par tout moyen approprié à un principe actif.

34°) Utilisation d'un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou d'un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention et au traitement des maladies infectieuses et du cancer.

25 35°) Utilisation d'un anticorps humanisé de classe IgA selon la revendication 27 ou d'un fragment de cet anticorps selon la revendication 28 ou la revendication 29, pour la préparation d'un réactif destiné au diagnostic des maladies infectieuses et du cancer.

1/8

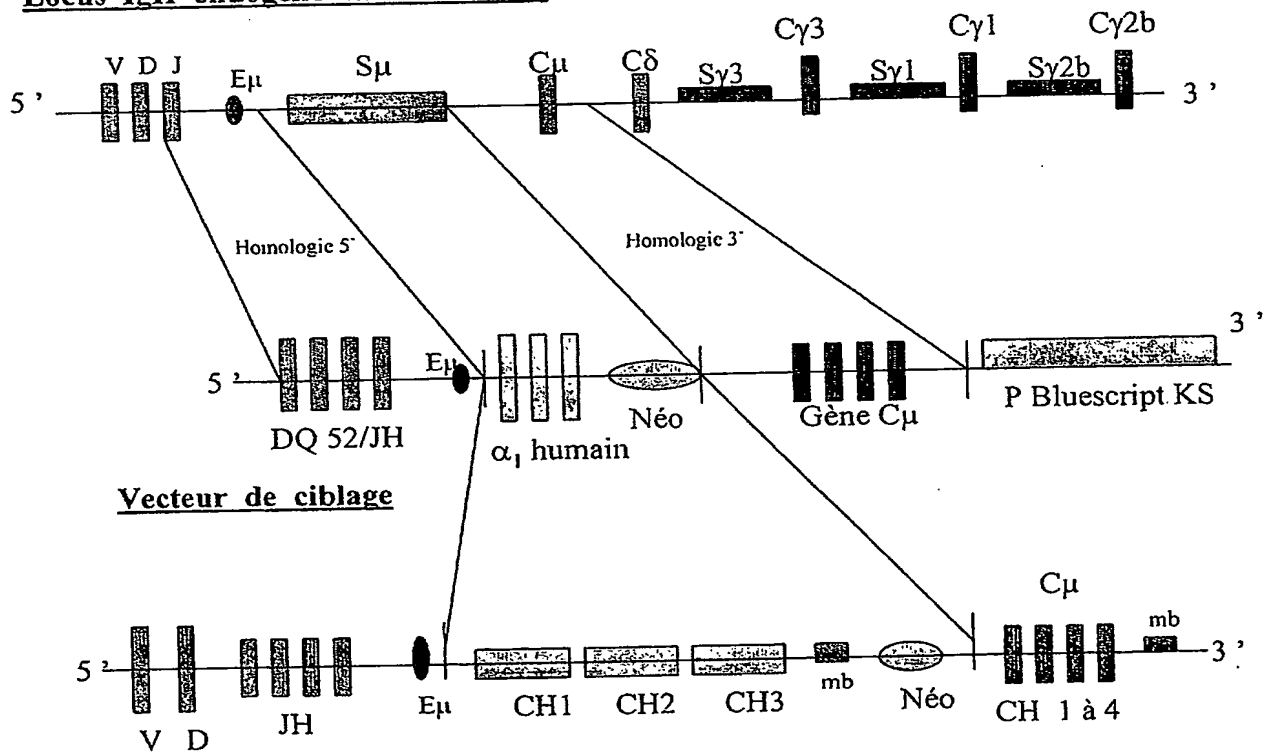
Locus IgH endogène chez la sourisLocus murin après recombinaison homologue

Figure 1

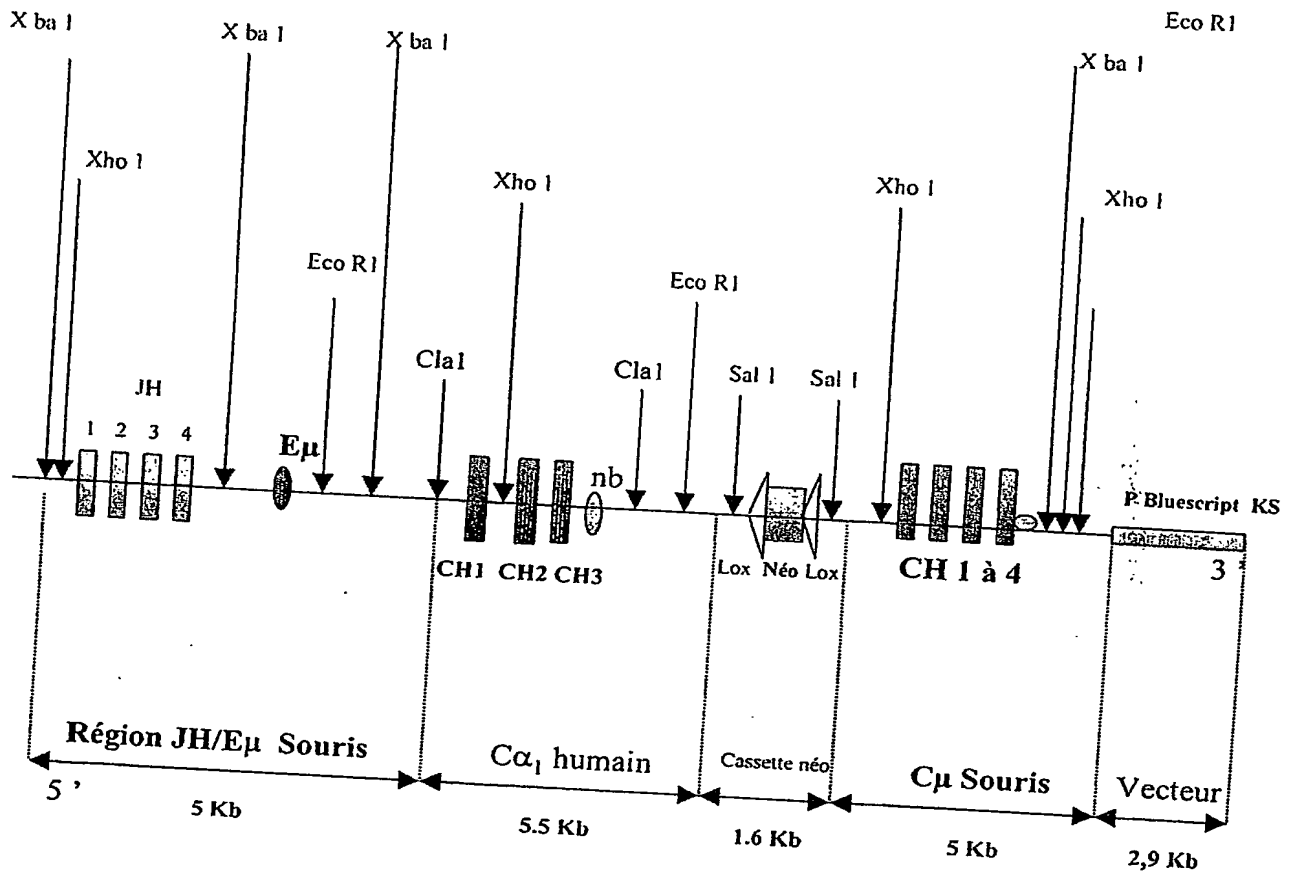


Figure 2



BEST AVAILABLE COPY

3/8

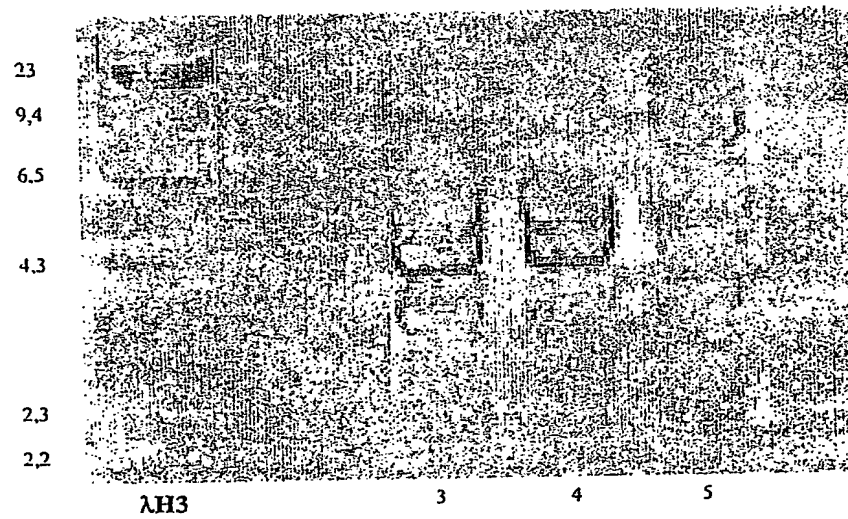


Figure 3

BEST AVAILABLE COPY

4/8

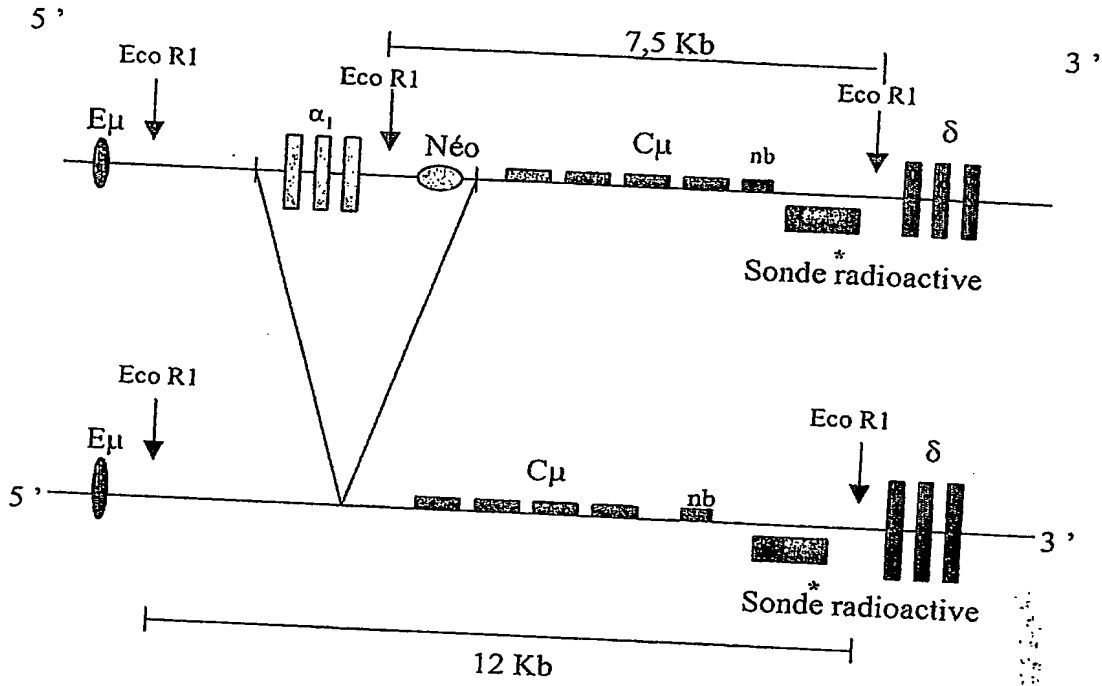


Figure 4

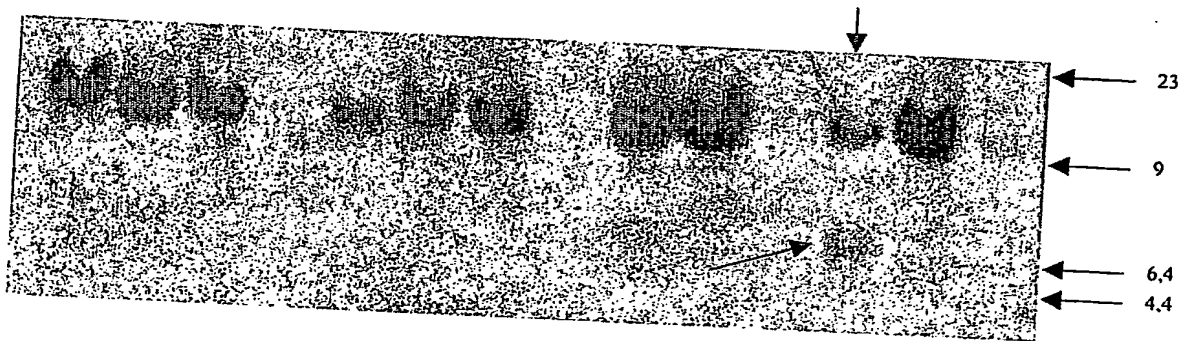


Figure 5

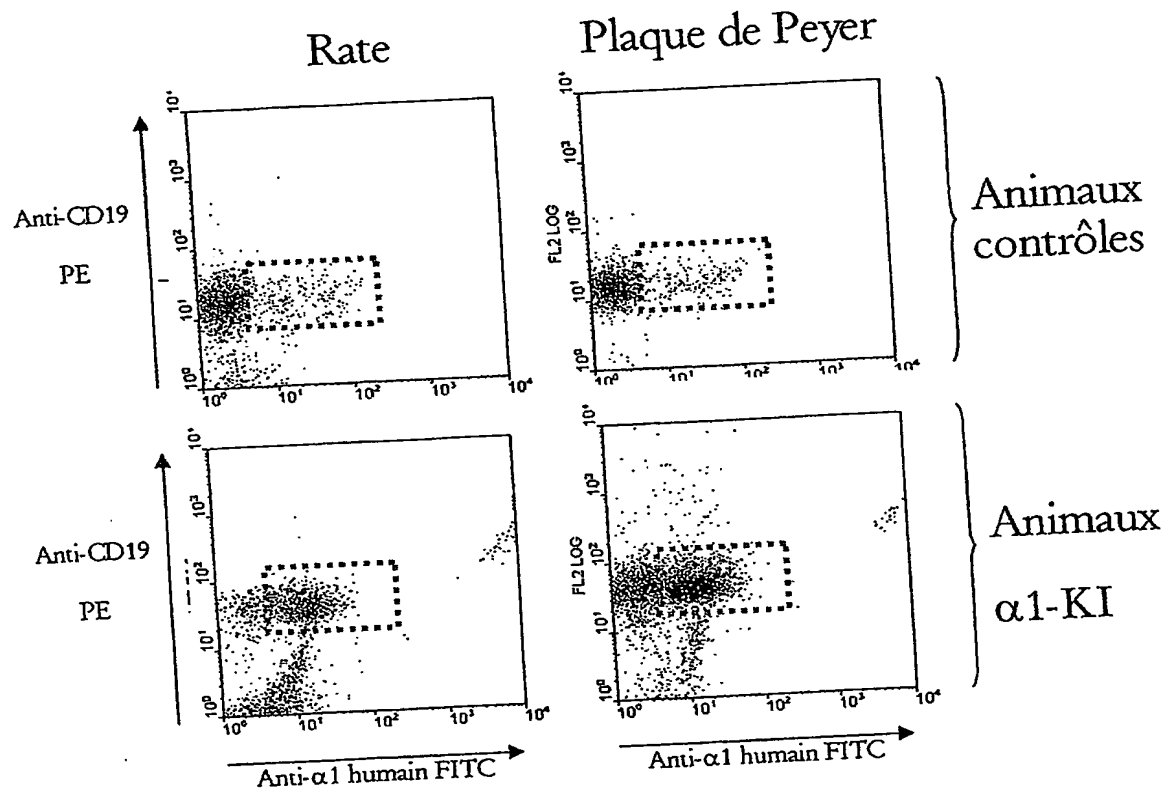


Figure 6

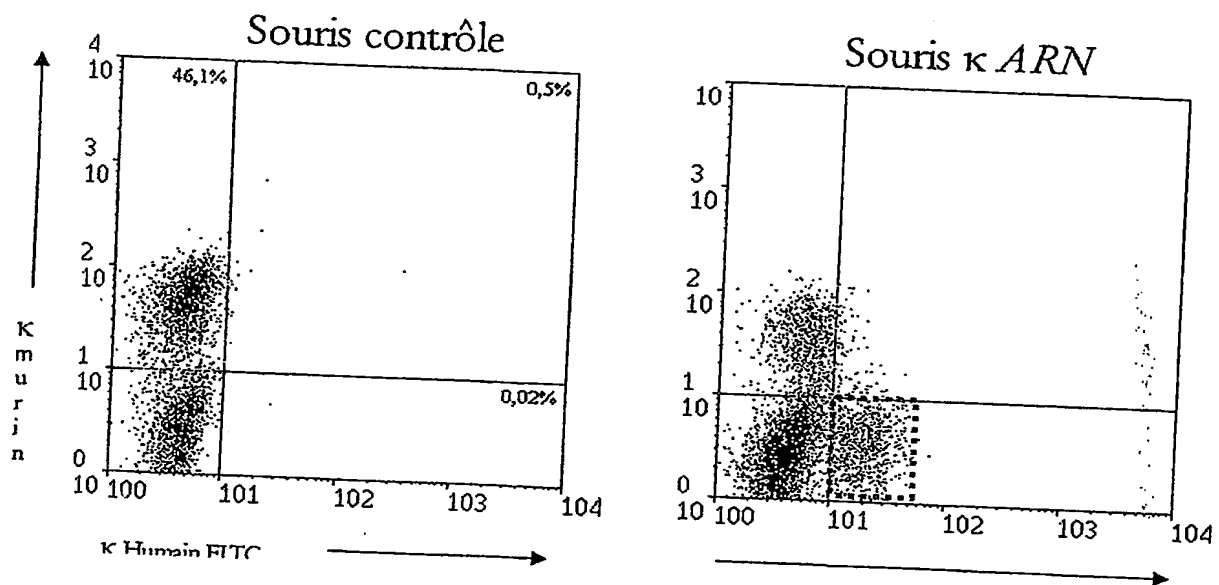


Figure 7

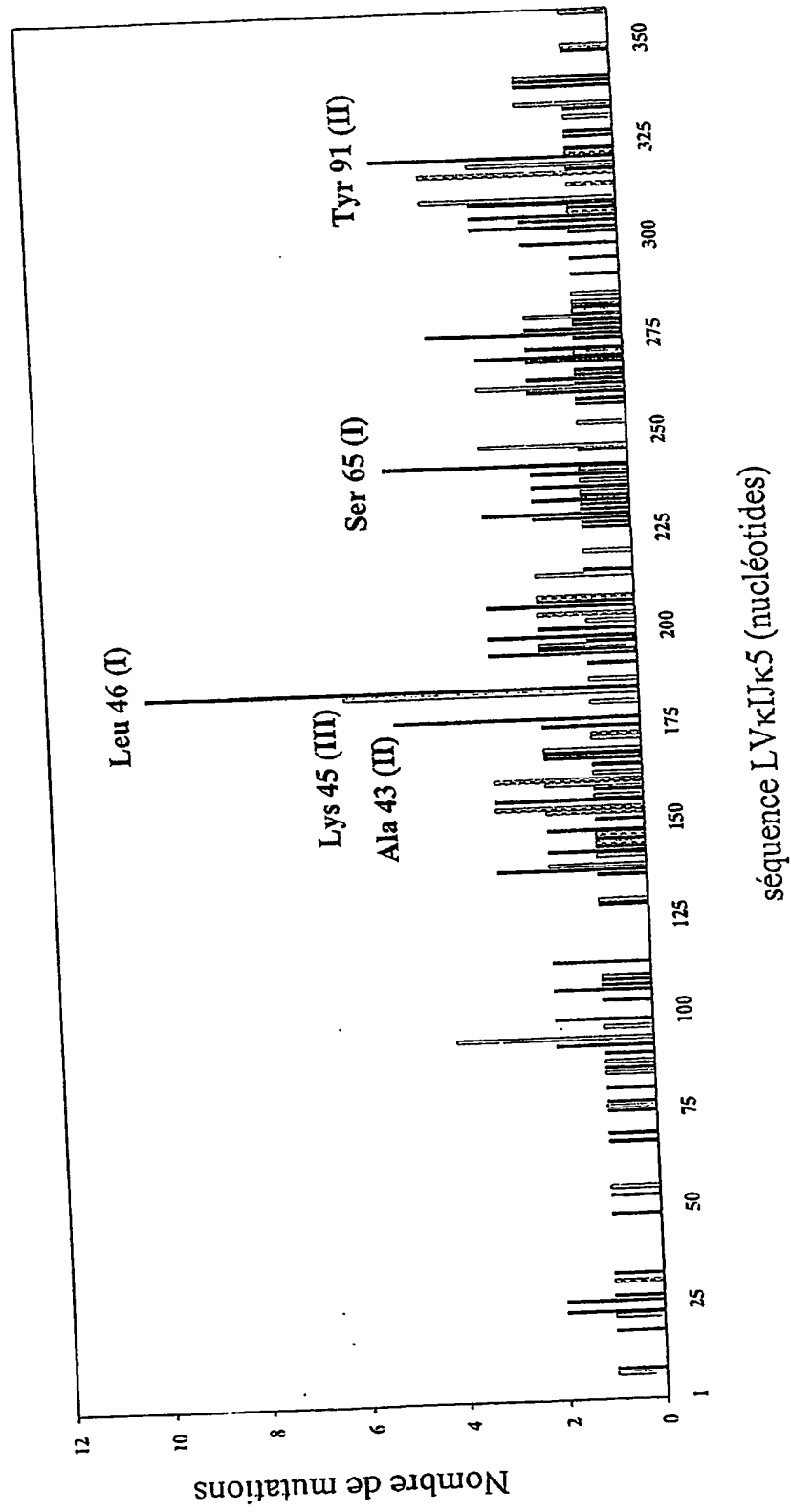


Figure 8

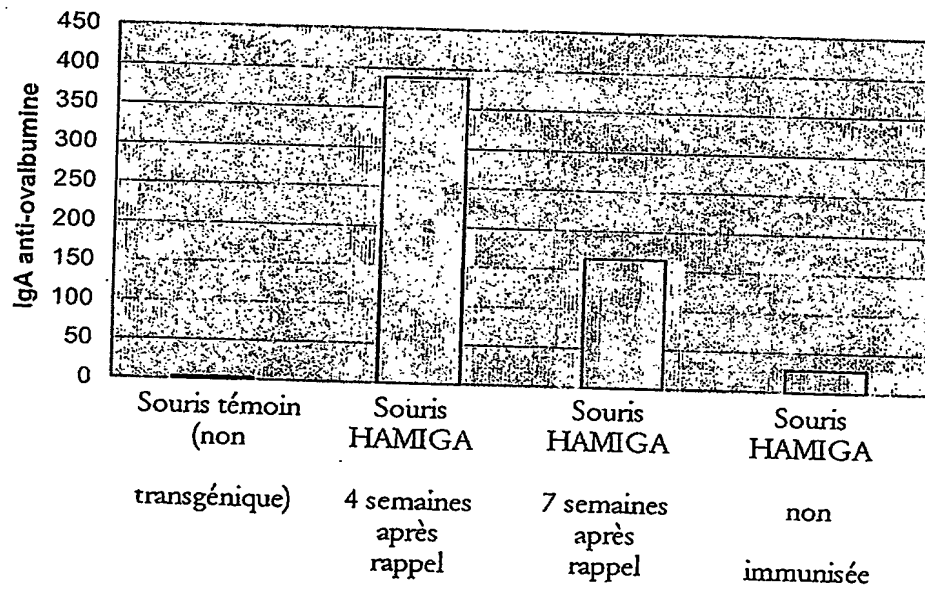


Figure 9

**DÉPARTEMENT DES BREVETS**26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1../2..(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		BLOcp644/115FR
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		0512502
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum) MAMMIFERE NON-HUMAIN TRANSGENIQUE POUR LA REGION CONSTANTE DE LA CHAINE LOURDE DES IMMUNOGLOBULINES HUMAINES DE CLASSE A ET SES APPLICATIONS.		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b> Nom		COGNE
Prénoms		Michel
Adresse	Rue	Allée des Charmes
	Code postal et ville	18171710 ISLE
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>2</b> Nom		SIRAC
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	7 rue de la Courtine
	Code postal et ville	181701010 LIMOGES
Société d'appartenance (facultatif)		
<b>3</b> Nom		BARDEL
Prénoms		Micael
Adresse	Rue	Le Landou
	Code postal et ville	18172710 COUZEIX
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <del>DU (DES) DEMANDEUR(S)</del> <del>OU DU MANDATAIRE</del> (Nom et qualité du signataire)  Le 24 octobre 2003,  Béatrice ORES (n° 92-4046)		

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ



N° 11235\*03

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

## DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp644/115FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0312502
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
MAMMIFERE NON-HUMAIN TRANSGENIQUE POUR LA REGION CONSTANTE DE LA CHAINE LOURDE DES IMMUNOGLOBULINES HUMAINES DE CLASSE A ET SES APPLICATIONS.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	DECOURT
	Prénoms	Catherine
Adresse	Rue	La Canne
	Code postal et ville	1817151710 RILHAC-RANCON
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	LE MORVAN
	Prénoms	Caroline
Adresse	Rue	Laurerie
	Code postal et ville	1817121610 VICQ-SUR-BREUIL
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
<p>Le 24 octobre 2003,</p> <p>Béatrice ORES (n° 92-4046)</p> 